

Phytohemagglutinin (PHA) 刺激リンパ球増殖性反応に 及ぼす人血清の年齢依存的抑制作用

血清 α_2 -Macroglobulin 濃度との関連について

金沢大学医学部小児科学教室 (主任: 谷口 昂教授)

押 田 喜 博

(昭和57年12月27日受付)

Phytohemagglutinin (PHA) 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす正常人血清の影響について年齢因子ならびに血清 α_2 -macroglobulin (α_2 -m) 濃度との関連について検討した。又、アトピー型気管支喘息患者血清の影響について同年齢正常人血清と比較検討した。血清は0-75歳までの正常人及びアトピー型気管支喘息患者より得た。suboptimal dose の PHA 濃度 ($3.0 \mu\text{g/ml}$) で年齢依存的抑制作用を認めた。即ち20歳以下の若年者血清及び61歳以上の高齢者血清は成人者血清に比し有意な抑制作用を示し ($P < 0.01$)、特に5歳以下の若年者血清に著しい抑制作用があった。一方、optimal dose の PHA 濃度 ($7.5 \mu\text{g/ml}$) では各年齢群の血清の影響には有意差を認めなかった。アトピー型気管支喘息患者血清と正常人血清とでは PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響には有意差はなかった。正常人血清中のこの抑制因子は分子量5万以上で硫酸塩析法では0-1.8 M 分画中にあり、その抑制活性は 80°C 、10分間の熱処理で失活した。血清 α_2 -m 濃度と年齢依存的抑制作用とは有意に相関していた ($P < 0.01$)。正常人血清より精製した α_2 -m は濃度依存的抑制作用を示し、 α_2 -m を含まない血清分画には抑制作用を認めなかった。以上のことから、正常人血清の年齢依存的抑制作用は血清 α_2 -m 濃度の違いにもとづくものと推察された。

Key words Normal human serum, PHA-stimulated lymphocyte proliferation, α_2 -Macroglobulin.

末梢血リンパ球の mitogen に対する増殖性反応は生体の免疫能の1つの指標として広く臨床的に活用されている。このリンパ球増殖性反応を検討する際の培養には血清の添加が必要であるが血清中にはリンパ球の mitogen に対する増殖性反応を抑制する因子の存在が知られており、ホジキン病、癌、ネフローゼ症候群をはじめ多数の病的血清中には抑制因子の存在を指摘する報告がある^{7)(17)~27)}。一方、正常人血清中にも immunoregulatory α -globulin (IRA) をはじめ何種類かの抑制因子の存在が報告されている^{6)~13)}。これらのうち α_2 -macroglobulin (以下 α_2 -m と略) がモル濃度あたり最大の抑制作用を有するとされている¹⁴⁾。又、肺癌やネ

フローゼ症候群では血清中の抑制因子は α_2 -m であるとする報告²¹⁾⁽²²⁾があり、血清中の免疫調節物質としての α_2 -m の役割が注目されている³⁷⁾。

α_2 -m は加齢に伴ない血清濃度が著しく変動し、新生児期には成人値とほぼ等しいが以後急速に増加し、2~4歳頃には成人値の2~3倍に達し、10歳以後に成人値に戻る変動のみられる血清蛋白である。この α_2 -m の加齢に伴ない血清濃度の変動は小児期の発育と平行し、成長と密接な関連を有するとされている³¹⁾。そこで正常人にみられる血清 α_2 -m 濃度の変動が細胞性免疫反応にどのような影響を及ぼすかを検討する目的で phytohemagglutinin (以下 PHA と略) 刺激リンパ球

Age-depnt Changes in Inhibitory Effect of Human Sera on Phytohemagglutinin (PHA)-stimulated Lymphocyte Proliferation: Its Relationship to Serum α_2 -Macroglobulin Concentration. Yoshihiro Oshida, Department of Pediatrics (Director: Prof. N. Tani-guchi), School of Medicine, Kanazawa University.

増殖性反応に及ぼす正常人血清の影響を年齢因子について検討するとともに、血清中 α_2 -m 濃度との関連について検討した。

アトピー性疾患では細胞性免疫能の低下が報告されており^{38)~42)}、アトピー型気管支喘息患者血清中に PHA 刺激リンパ球増殖性反応を抑制する因子の存在を指摘する報告もある⁴³⁾。そこで、アトピー型気管支喘息患者血清について、PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響を同年齢正常人血清と比較検討した。

対象および方法

1. 対 象

0~75 歳の健康正常人 275 名と発作間歇期で 48 時間以上薬剤を服用していないアトピー型気管支喘息患者 100 名より血清を得た。年齢は以下の如くに区分した。I 群, 0~5 歳; II 群, 6~10 歳; III 群, 11~20 歳; IV 群, 21~40 歳; V 群, 41~50 歳; VI 群, 51~60 歳; VII 群, 61~75 歳。

2. 被検血清及び標準血清の調整

血液型や HLA 等の個体差による影響を避けるため⁷⁾²⁷⁾、各年齢群の 5 名の血清を均等に混合して被検血清を作製した。標準血清として 25~35 歳の健康成人 15 名の血清を均等に混合して作製した。各血清は 56°C, 30 分間不活化し、-20°C にて保存した。

3. リンパ球の培養法

健康成人よりのヘパリン加末梢血を phosphate buffered saline (PBS) にて希釈後、lymphoprep 比重遠心法にて分離し、RPMI 1640 培養液 (GIBCO, Grand Island, NY) にて 1×10^6 /ml に調整した mononuclear cell を得た。 1×10^5 の cell を 10% 血清を含む RPMI 1640 培養液 0.2 ml に浮遊させ、PHA-P (Difco Lab, USA) を最終濃度が $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, $7.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加し、microplate 法にて triplicate で 37°C, 5% CO_2 濃度で 72 時間培養した。培養終了 24 時間前に tritiated thymidine (New England Nuclear, Boston, 以下 ^3H -TdR と略) を $0.2 \mu\text{Ci}$ を添加した。培養終了後に cell harvester を用い harvest し、液体シンチレーションカウンターで ^3H -TdR の取り込みを測定した。cell viability は trypan blue dye exclusion により検討した。

4. 血清の分画

1) Amicon CF 50 A による限外濾過

Amicon CF 50 A (Amicon Lexington, Mass, USA) により I, II, III 群の各血清より分子量 5 万以下の分画を得た。この分画を PHA $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, 各血清 10% を含む培養系に 20% に添加し、リンパ球増殖性反応に及ぼす影響を検討した。

2) 硫酸塩析法による分画

I-IV 群の各血清に硫酸粉末を攪拌しながら加え、約 30 分間攪拌後、10,000 rpm, 4°C, 10 分間遠心により、0~3.0 M まで 4 段階に分画し、各分画を Fraction I (0~1.3 M), Fraction II (1.3~1.8 M), Fraction III (1.8~2.4 M), Fraction IV (2.4~3.0 M) とした。各 Fraction を PBS にて透析後、PHA $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, 標準血清 10% を含む培養系に $300 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように添加した。

5. α_2 -m の測定

免疫拡散法 (バルチゲン, ヘキストジャパン社) により被検血清中の α_2 -m の濃度を測定した。

6. α_2 -m の精製

Ganrot ら³⁸⁾の方法に準じ精製した。

健康成人 (25~35 歳) 20 名よりなるプール血清 100 ml に 10% 硫酸デキストラン 2.0 ml, 1 M MgCl_2 10 ml を加え、10,000 rpm, 4°C, 15 分間遠心にてリポ蛋白質を除去し、上清を 0.5 M NaCl を含む 0.05 M リン酸緩衝液中で 24 時間透析した。透析後に硫酸粉末を攪拌しながら加え、2 M 濃度にして 10,000 rpm, 4°C, 10 分間遠心した。沈渣をペロナール緩衝液中で 48 時間透析し、寒天電気泳動 (pH 8.6 ペロナール緩衝液, 150 mA, 24 時間) を行った。 α -globulin 分画を pH 8.6, 0.05 M ホウ酸ナトリウム, 0.15 M NaCl 中にて 24 時間透析して Sephadex G-200 SF (Pharmacia, Uppsala) のカラムに通した (緩衝液は pH 8.6, 0.05 M ホウ酸ナトリウム, 0.15 M NaCl)。第 1 分画をウサギ抗ヒト全血清及び抗ヒト α_2 -m を用いて免疫電気泳動を行った。抗ヒト全血清及び抗ヒト α_2 -m と単一の沈降線を作り、含有される蛋白質のすべては α_2 -m であった。

上記の寒天電気泳動及び gel filtration により得られた各分画を PHA $3.0 \mu\text{g}/\text{ml}$, 標準血清 10% を含む培養系に $500 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度になるよう添加し、精製 α_2 -m も同様にして、500, 250, 125, $62.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の各濃度になるよう添加して PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響を検討した。尚、蛋白濃度の測定には Lowry の方法⁴⁵⁾に拠った。

7. 血清、血清分画及び精製 α_2 -m の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響の表記法

1) 血清の影響

% Response (%) = (被検血清 10% 加培養 PHA 刺激リンパ球の Δ cpm) \div (標準血清 10% 加培養 PHA 刺激リンパ球の Δ cpm) $\times 100$

2) 血清分画及び精製 α_2 -m の影響

% Response in 10% serum もしくは % Response in standard serum として以下のように表記した。

i) % Response in 10 % serum(%) = (被検血清 10% + 血清分画加培養 PHA 刺激リンパ球の Δ cpm) \div (被検血清 10% 加培養 PHA 刺激リンパ球の Δ cpm) \times 100

ii) % Response in standard serum(%) = (標準血清 10% + 血清分画加培養 PHA 刺激リンパ球の Δ cpm) \div (標準血清 10% 加培養 PHA 刺激リンパ球の Δ cpm) \times 100

成 績

1. 各年齢群血清の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響

Suboptimal dose の PHA 濃度 $3.0 \mu\text{g/ml}$ では各年齢群血清の % Response (Mean \pm 1 SD %) はそれぞれ次のようであった。I 群, 65.9 ± 14.8 ; II 群, 85.6 ± 10.5 ; III 群, 89.1 ± 16.6 ; IV 群, 106.8 ± 8.7 ; V 群, 106.0 ± 11.3 ; VI 群, 99.7 ± 22.3 ; VII 群, 69.6 ± 18.4 。20 歳以下の I—III 群の各血清は成人者血清の IV 群に比し有意な反応の低下がみられた ($P < 0.01$)。特に 5 歳以下の I 群の血清に著しい反応の低下がみられた。又, 61 歳以上の VII 群の血清でも反応の低下がみられた (図

1-a)。Optimal dose の PHA 濃度 $7.5 \mu\text{g/ml}$ では各年齢群の血清の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響には有意差はみられなかった (図 1-b)。

アトピー型気管支喘息患者血清と正常人血清との比較では PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響は有意差はみられなかった (図 1-a, 1-b)。

2. 血清濃度の影響

I, II, III, IV, VII 群の各血清について培養系の各血清濃度を 10, 20, 30 % と増加して PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす血清濃度の影響を検討した。結果は 10 % 血清濃度に対する百分率として % Response in 10 % serum(%) と表記した。PHA 濃度 $3.0 \mu\text{g/ml}$ では全ての群の血清で血清濃度の増加に伴ない反応の低下がみられ、特に 5 歳以下の I 群と 61 歳以上の VII 群の血清に著しい低下がみられた (表 1)。PHA 濃度 $7.5 \mu\text{g/ml}$ では血清濃度が 20, 30 % での % Response in 10 % serum (Mean \pm 1 SD %) はそれぞれ I 群 (92.0 ± 12.1 , 36.9 ± 4.8), IV 群 (105.0 ± 11.0 , 70.5 ± 6.8), VII 群 (82.2 ± 11.1 , 76.1 ± 23.5) であり、血清濃度を 20 % にしても反応の低下はみられず血清濃度を 30 % と増加すると I 群の血清にのみ反応の低下がみられた。

Fig. 1-a

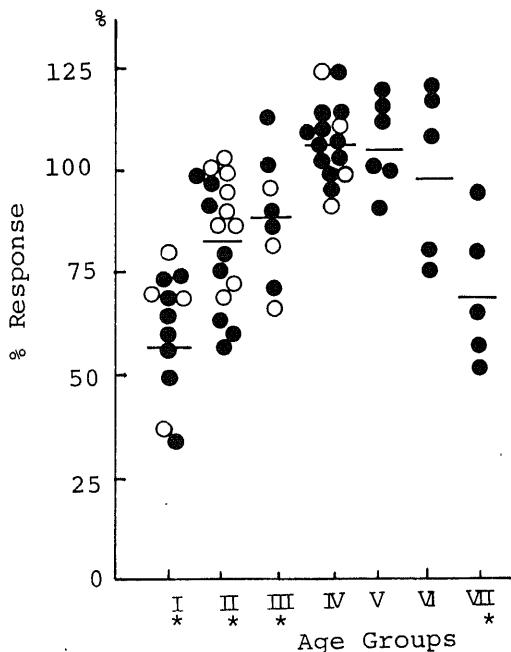


Fig. 1-b

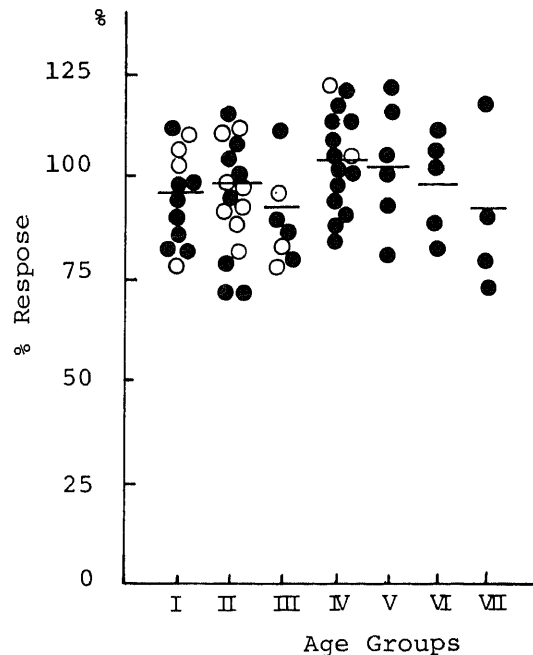


Fig. 1-a, 1-b. Effect of serum from each age group on lymphocyte proliferation to suboptimal dose of PHA ($3.0 \mu\text{g/ml}$) [Fig. 1-a] and optimal dose of PHA ($7.5 \mu\text{g/ml}$) [Fig. 1-b]. Standard serum = 100% transformation. Atopy (O), Non-atopy (●). * Significantly different from age group IV. Bar represent mean value.

3. 血清分画の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響

1) Amicon CF 50 A による血清分画

I, II, III群の血清より分子量 5 万以下の分画を Amicon CF 50 A による限外濾過によって得た。この血清分画を PHA 濃度 $3.0 \mu\text{g/ml}$, 各血清を 10 % 含む培養系に 20 % の濃度になるように添加した。結果は非添加時に対する百分率として % Response in 10 % serum (%) と表記した。各群の血清で血清濃度 30 % でみられたような反応の低下はみられなかった (表 1)。

2) 硫酸塩析法による血清分画

I, II, III, IV群の各血清より得られた硫酸分画 (Fr) より, Fr I ($0-1.3 \text{ M}$), Fr II ($1.3-1.8 \text{ M}$), Fr III ($1.8-2.4 \text{ M}$), Fr IV ($2.4-3.0 \text{ M}$) を PHA 濃度 $3.0 \mu\text{g/ml}$, 標準血清を 10 % 含む培養系に $300 \mu\text{g/ml}$ に添加した。結果は非添加時に対する百分率として % Response in standard serum (%) と表記した。全群の Fr I で著明な反応の低下がみられ, I 及び II 群では Fr I

以外に Fr II にも反応の低下がみられた (表 2)。I 及び II 群の Fr I を 80°C , 10 分間の熱処理した。% Response in standard serum (Mean $\pm 1 \text{ SD}$ %) はそれぞれ I 群, 85.5 ± 9.7 ; II 群, 101.7 ± 10.5 とこの抑制活性は失活した。

4. 各年齢群血清の α_2 -m 濃度と % Response との関連

α_2 -m は分子量 72.5 万, 硫酸塩析では $1.2-1.8 \text{ M}$ 分画に含まれる。そこで各年齢群の血清 α_2 -m 濃度を測定して % Response との関連について検討した。I, II, III群の若年者血清では α_2 -m 濃度は高値で % Response は低値であった。又, VII群の血清でも % Response の低値の血清は α_2 -m 濃度は高値であった。全体として α_2 -m 濃度と % Response は $r = -0.580$, $Y = -0.11X + 125$ ($P < 0.01$) と有意な負の相関がみられた (図 2)。

5. 精製 α_2 -m 及び精製過程の血清分画の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響

Table 1. Effect of varying serum concentrations and serum fraction obtained by Amicon CF50A on lymphocyte proliferation to PHA ($3.0 \mu\text{g/ml}$). 10% Test serum=100% transformation. The data represent mean $\pm 1 \text{ SD}$ ($n=6$). ND, not done.

Age group	% Response in 10% serum (%)		Amicon CF50A ultrafiltrate
	Serum concentration (%) 20	30	
I	32.6 ± 5.9	20.9 ± 16.4	79.7 ± 24.1
II	43.8 ± 9.0	31.5 ± 8.6	92.2 ± 14.3
III	54.5 ± 10.8	32.4 ± 6.2	83.4 ± 15.0
IV	46.9 ± 5.9	28.7 ± 6.3	ND
VII	40.9 ± 2.9	15.6 ± 4.5	ND

Table 2. Effect of serum fractions obtained by ammonium sulfate precipitation on lymphocyte proliferation to PHA ($3.0 \mu\text{g/ml}$). Each serum fraction was added to culture system containing 10% standard serum and $3.0 \mu\text{g/ml}$ of PHA to make a final concentration of $300 \mu\text{g/ml}$. Standard serum alone=100% transformation. The data represent mean $\pm 1 \text{ SD}$ ($n=6$).

Age group	% Response in standard serum (%)			
	Ammonium sulfate fractions (M)			
	Fr I ($0-1.3$)	II ($1.3-1.8$)	III ($1.8-2.4$)	IV ($2.4-3.0$)
I	48.3 ± 8.4	71.2 ± 3.7	94.1 ± 11.1	93.6 ± 3.6
II	65.0 ± 4.3	71.4 ± 3.6	95.1 ± 4.0	84.6 ± 5.6
III	71.5 ± 7.3	95.5 ± 13.2	111.3 ± 9.5	124.5 ± 1.5
IV	65.5 ± 8.5	87.5 ± 11.3	117.6 ± 17.1	104.5 ± 6.7

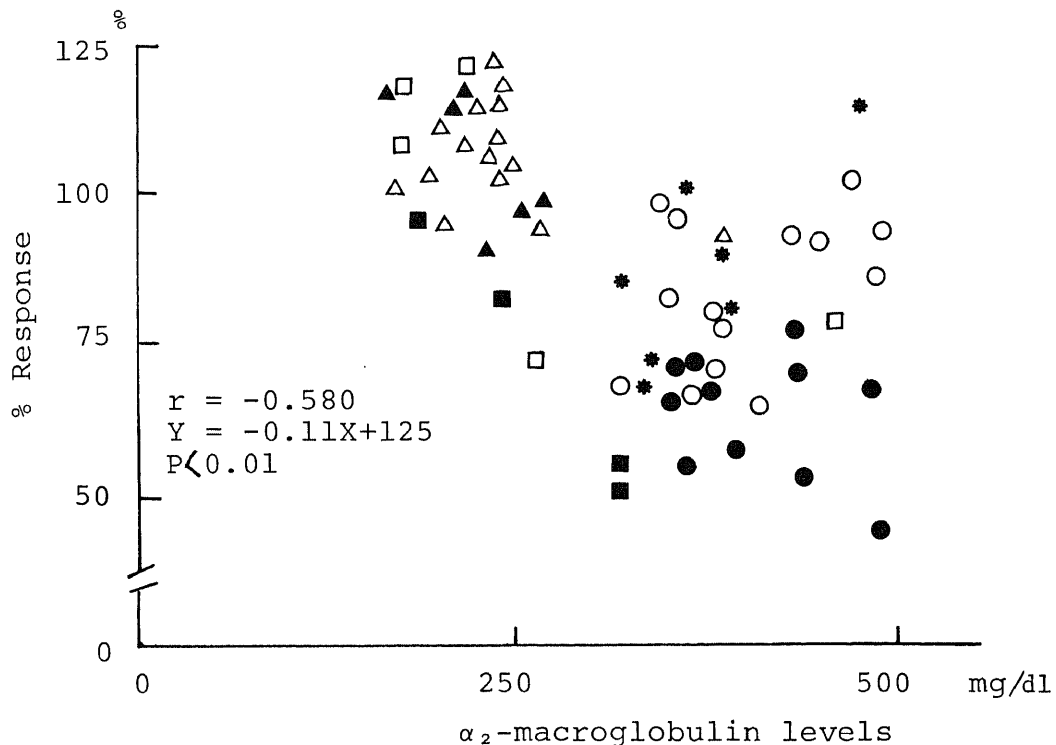


Fig. 2. Correlation between serum α_2 -macroglobulin level and % Response. Age group; I (●), II (○), III (*), IV(Δ), V(▲), VI(□), VII(■).

1) 寒天電気泳動分画

寒天電気泳動により得られた Fraction 1 から Fraction 20 までのうち、第 1 のピークより Fraction 4、第 2 のピークより Fraction 13、更に Fraction 18 を PHA 濃度 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 、標準血清を 10% 含む培養系に $500 \mu\text{g/ml}$ に添加した。結果は非添加に対する百分率として % Response in standard serum (%) と表記した。Fraction 13 にのみ反応の低下がみられた (図 3-a)。

2) Sephadex G-200 SF

上記で得られた Fraction 13 は更に Sephadex G-200 SF のカラムにより 2 つのピークに分画された。各分画の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響を 5-1) と同様な実験条件で検討した。第 1 分画にのみ反応の低下がみられ、この分画は免疫電気泳動で抗ヒト全血清及び抗ヒト α_2 -m と単一の沈降線を作り、含有される蛋白質の全ては α_2 -m であった (図 3-b)。

3) 精製 α_2 -m の影響

上記 5-2) で得られた精製 α_2 -m を PHA 濃度 $3.0 \mu\text{g/ml}$ 、標準血清を 10% 含む培養系に 500, 250, 125, $67.5 \mu\text{g/ml}$ になるように添加した。結果は非添加時に

対する百分率として % Response in standard serum (%) と表記した。 α_2 -m は濃度依存的に反応を低下させ、この反応の低下は生体内生理的濃度以下の低濃度でみられた (図 4)。

以上の実験においては trypan blue dye exclusion により細胞障害性がないことが確認された。

考 察

古くから血清中には免疫抑制物質が存在することが知られており、Kamrin がラット Cohn IV 分画がラット皮膚同種移植拒絶反応を抑制することを報告して以来、血漿蛋白分画中の細胞性免疫反応抑制因子の存在が明らかになり多数の検討がなされてきた¹⁾⁻³⁾。Mannick⁴⁾、Cooperband⁵⁾⁸⁾⁻¹⁰⁾らは正常人血漿の α -globulin を主成分とする分画が in vivo, in vitro で細胞性免疫を抑制することを認めこの分画を immunoregulatory α -globulin と報告した。又、Nelken¹¹⁾¹²⁾⁴⁴⁾らも正常人血清より分離した免疫抑制作用を有する蛋白分画を normal immunosuppressive protein (Nip) として α -globulin 分画に含まれる糖蛋白

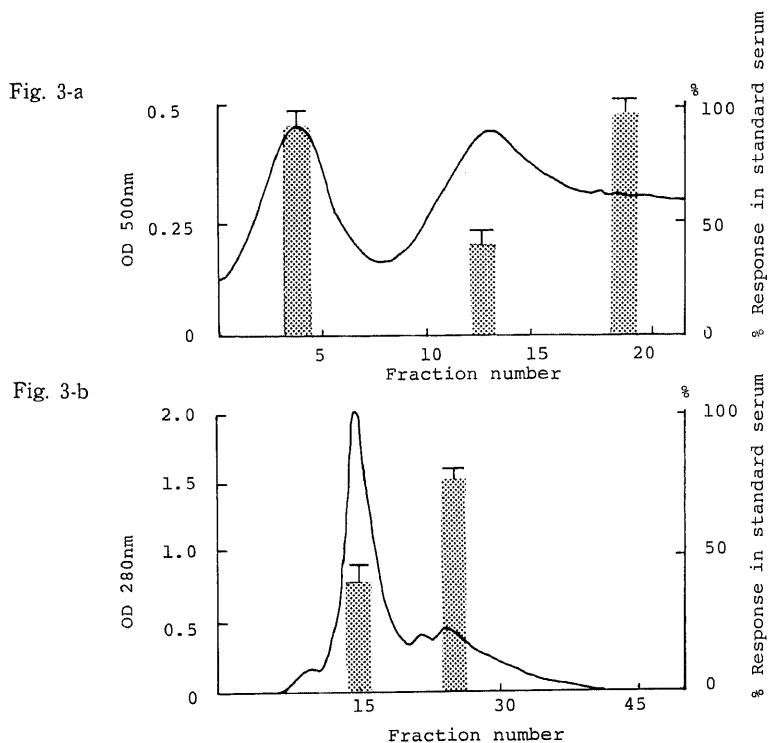


Fig. 3-a, 3-b. Effect of serum fractions obtained by agarose electrophoresis [Fig. 3-a] and Sephadex G-200 SF column [Fig. 3-b] on lymphocyte proliferation to PHA ($3.0 \mu\text{g/ml}$). Each serum fraction was added to culture system containing 10% standard serum and $3.0 \mu\text{g/ml}$ of PHA to make a final concentration of $500 \mu\text{g/ml}$. Standard serum alone=100% transformation. The data represent mean ± 1 SD on three separate experiments.

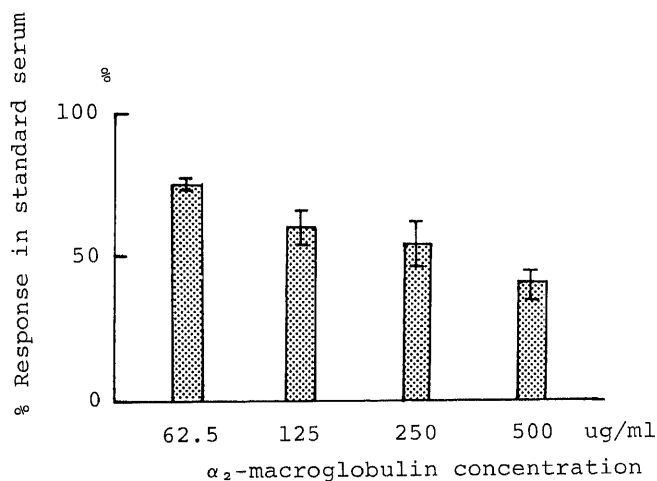


Fig. 4. Effect of purified α_2 -macroglobulin on lymphocyte proliferation to PHA ($3.0 \mu\text{g/ml}$). Purified α_2 -macroglobulin was added to culture system containing 10% standard serum and $3.0 \mu\text{g/ml}$ of PHA to make a final concentration of 62.5, 125, 250 and $500 \mu\text{g/ml}$. Standard serum alone=100% transformation. The data represent mean ± 1 SD on three separate experiments.

であると報告している。

Chase¹⁴⁾は正常人血清より分離した α_2 -m が con-canavalin A (Con A) 刺激リンパ球増殖性反応に対してモル濃度あたり最大の抑制作用を認めたと報告している。一方、前述したように肺癌患者血清やネフローゼ症候群患者血清が PHA 刺激リンパ球増殖性反応を抑制し、その抑制活性は α_2 -m にもとづくものであるとの報告²¹⁾²²⁾がある。そこで加齢に伴ない血清中濃度が大きく変動する α_2 -m について、その変動が細胞性免疫反応に及ぼす影響をもたすかを検討する目的で、正常リンパ球の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす人血清の年齢因子について検討した。同時にアトピー型気管支喘息患者血清についても正常人血清と対比して PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響を検討した。

正常人リンパ球の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に対して、suboptimal dose の PHA 濃度 (3.0 μ g/ml) では若年者血清 (I—III 群) は成人者血清に比し有意に反応を低下させており、特に 5 歳以下の I 群の血清に著しい反応の低下がみられた。この反応の低下は血清中の抑制作用を有する蛋白質によることが次の実験結果より推察された。1) 培養系に含まれる血清の濃度を増加した時いずれの年齢群の血清でも反応の低下がみられた。2) この反応の低下は分子量 5 万以下の分画にはみられなかった。3) 血清の硫酸塩析による分画では、各年齢群の血清において 0—1.3 M (Fr I) の分画で反応の低下がみられ、80°C、10 分間の熱処理により反応の低下はみられなくなった。4) 血清及び血清分画には細胞障害性作用がないことが確認された。

Chase¹⁴⁾は正常人血清の硫酸分画 1.0—2.0 M 分画に PHA 刺激リンパ球増殖性反応に対して強い抑制作用を認め、更にこの分画に含まれる蛋白質の中で α_2 -m に最大の抑制作用があったと報告している。著者も正常人血清の硫酸分画では 0—1.3 M 分画中に強い抑制作用を認め、更に若年者血清では 1.3—1.8 M 分画中にも抑制作用を認めた。このようなことから正常人血清の PHA 刺激リンパ球増殖性反応の抑制作用は α_2 -m によるものと推測した。そこで血清 α_2 -m 濃度と血清抑制作用について検討し両者の間に有意の相関を認めた。即ち正常人血清の PHA 刺激リンパ球増殖性反応に対する抑制作用は加齢に伴う α_2 -m の生理的変動に一致していた。又、著者が正常人血清より精製分離した α_2 -m は PHA 刺激リンパ球増殖性反応に対し濃度依存的な抑制作用を示し、 α_2 -m を含まない血清分画では抑制作用は殆んどなかった。以上のことから α_2 -m 以外にも免疫抑制作用を有する血清蛋白は多数報告されているが^{7)16)28)~30)}、 α_2 -m の加齢に伴う血清濃度の

大きな変動を考慮すると、正常人血清の年齢依存的 PHA 刺激リンパ球増殖性反応抑制作用は加齢に伴う α_2 -m の量的差異が大きく関与しているものと推察された。

α_2 -m のこの抑制機序として、培養系の PHA 濃度が optimal であれば正常人血清の年齢依存的抑制作用がみられなかったことから、 α_2 -m が糖蛋白質としての性質により PHA と直接結合する作用¹⁴⁾あるいはリンパ球の受容体と競合するといった直接相互作用が考えられる。又、 α_2 -m の protease inhibitor としての作用により、リンパ球表面の protease と作用し、PHA 刺激リンパ球増殖性反応³³⁾、リンパ球混合培養³⁴⁾、antibody dependent cell-mediated cytotoxicity³⁵⁾、natural killer cell cytotoxicity³⁶⁾などを抑制するとの報告や、 α_2 -m がリンパ球に結合することにより抗原刺激による macrophage slowing factor¹⁵⁾の産生を抑制する報告もあり、 α_2 -m は種々複雑な作用機序で免疫調節作用を有していると考えられた。

血清中の α_2 -m 濃度は肝疾患、ネフローゼ症候群で増加することが知られ、更にネフローゼ症候群患者血清が PHA 刺激リンパ球増殖性反応を抑制したとする報告²²⁾がある。しかし、著者の検討では血清 α_2 -m 濃度は大部分年齢相当の生理的濃度内にあり、抑制作用のあった若年者血清においても α_2 -m 濃度は生理的濃度内にあった。又、精製した α_2 -m は生理的濃度以下の低濃度においても PHA 刺激リンパ球増殖性反応を抑制していた。このことは Chase¹⁴⁾や Ades³⁸⁾の報告と一致するが Goutner ら⁴⁰⁾は α_2 -m は PHA 刺激リンパ球増殖性反応に対して低濃度で増強作用を、生理的濃度では抑制作用を示すと報告しており、作用機序とあわせて今後解決されねばならない問題点である。

アトピー型気管支喘息をはじめとするアトピー性疾患は高 Ig E 血症を特徴としている。その原因のひとつとして細胞性免疫能とくに T 細胞の欠陥が指摘され、T 細胞数の低下や PHA, Con A, purified protein derivative (PPD) 等に対するリンパ球増殖性反応の低下が報告^{38)~42)}されている。又、Strannegård ら⁴³⁾は正常人にくらべアトピー疾患患者血清が PHA, Con A, PPD 等に対するリンパ球増殖性反応を強く抑制すると報告している。しかし著者の検討ではアトピー型気管支喘息患者血清は正常人血清と同程度に年齢依存的に PHA 刺激リンパ球増殖性反応を抑制しており、正常人血清との相異は認められなかった。Strannegård ら⁴³⁾の報告ではアトピー疾患患者の年齢が 4—16 歳と幅があり、著者の示した年齢的差異が考慮されていない可能性がある。このことから各種の病的血清の免疫抑制作用の検討には age-matched control が必要とおもわれた。

血清 α_2 -m 濃度は乳児期には成人の2倍以上であり、以後加齢に伴ない減少していく。この加齢に伴う血清濃度の変動が成長発育にどのような意義を有するかは不明であるが、PHA 刺激リンパ球増殖性反応に対する正常人血清の年齢依存的抑制作用が α_2 -m の加齢に伴う血清濃度の変動に一致していたことは免疫機構の発達の面から興味深いものとおもわれた。

結 論

PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす正常人及びアトピー型気管支喘息患者血清の影響と血清 α_2 -m 濃度との関連について検討した。又、正常人血清より精製した α_2 -m が PHA 刺激リンパ球増殖性反応にどのような影響を及ぼすか検討し以下の結論を得た。

1. suboptimal dose の PHA 濃度 (3.0 μ g/ml) では若年者血清の I-III 群及び高齢者血清の VII 群は成人者血清の IV 群に比し PHA 刺激リンパ球増殖性反応を有意に抑制していた ($P < 0.01$)。特に5歳以下の I 群に著しい抑制作用を認めた。

2. optimal dose の PHA 濃度 (7.5 μ g/ml) では各年齢群の血清の影響には有意差を認めなかった。

3. アトピー型気管支喘息患者血清と正常人血清とは PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす影響には有意差を認めなかった。

4. suboptimal dose の PHA 濃度 (3.0 μ g/ml) でみられた若年者血清の抑制因子は分子量5万以上で硫酸塩析法では 0~1.8 M 分画中に存在し、80°C、10 分間の熱処理で失活する蛋白質であった。この蛋白質には細胞障害作用は認めなかった。

5. 血清 α_2 -m 濃度と抑制作用は有意に相関していた。($Y = -0.11X + 125$, $r = -0.580$, $P < 0.01$)

6. 正常人血清より精製した α_2 -m は PHA 刺激リンパ球増殖性反応を濃度依存的に抑制した。又、 α_2 -m を含まない血清分画には抑制作用を認めなかった。

以上の実験結果より PHA 刺激リンパ球増殖性反応に及ぼす正常人血清の年齢依存的抑制作用は血清 α_2 -m 濃度の加齢に伴う変動に一致しており、血清 α_2 -m 濃度の差異にもとづくものと推察された。又、この血清 α_2 -m 濃度の年齢に伴う変動は小児免疫機構の発達と何らかの関連を有するものと示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、御指導、御校閲を賜った恩師谷口昂教授に深甚の謝意を表します。また直接御指導、御教示下さいました平谷美智夫博士に深く感謝いたします。

本論文の要旨は第30回日本アレルギー学会総会において発表した (1980, 東京)。

文 献

- 1) Karmrin, B. B.: Successful skin homograft in mature nonlitterman rat treated with fractions containing alpha - globulins. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **100**, 58 - 61 (1959).
- 2) Mowbray, J. F. Effect of large doses of an α - glycoprotein fraction on the survival of rat skin homograft. *Transplantation*, **1**, 15 - 20 (1963).
- 3) Mowbray, J. F.: Ability of large doses of an alpha plasma protein fraction to inhibit antibody production. *Immunology*, **6**, 217 - 225 (1963).
- 4) Mannick, J.A. & Schmid, K.: Prolongation of allograft survival by alpha globulin isolation from normal blood. *Transplantation*, **5**, 1231 - 1238 (1967).
- 5) Cooperband, S.R., Bondevik, H., Schmid, K. & Mannick, J.A.: Transplantation of humn lymphocytes: Inhibition by homologous alpha globulin. *Science*, **159**, 1243 - 1244 (1968).
- 6) Cooperband, S.R., Davis, R.C., Schmid, K. & Mannick, J.A.: Competitive blocked of lymphocyte stimulation by a serum immuno - regulatory alpha globulin (IRA). *Transplant. Proc.*, **1**, 516 - 523 (1969).
- 7) Nelson, D.S. & Gatti, R.A.: Humoral factors influencing lymphocyte transformation. *Prog. Allergy*, **21**, 261 - 341 (1976).
- 8) Cooperband, S.R., Nimberg, R. & Mannick, J.A.: Humoral immunosuppressive factors. *Transplant. Proc.*, **8**, 225 - 242 (1976).
- 9) Cooperband, S.R., Badger, A.M., Davis, R. C., Schmid, K. & Mannick, J.A.: The effect of immunoregulatory α - globulin (IRA) upon lymphocyte in vitro. *J. Immunol.*, **109**, 154 - 163 (1972).
- 10) Occhino, J.C., Glasgow, A.H., Cooperband, S.R., Mannick, J.A. & Schmid, K.: Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from human plasma. *J. Immunol.*, **110**, 685 - 694 (1973).
- 11) Nelken, D.: Normal immunosuppressive protein. *J. Immunol.*, **110**, 1161 - 1162 (1973).
- 12) Hanna, N., Kalderon, R. & Nelken, D.: Inhibition of T- and B- lymphocyte function by normal immunosuppressive protein. *Immunology*, **29**, 433 - 443 (1975).
- 13) Voorting - Hawking, M. & Michael, J.G.: Isolation and characterization of immunoregulatory

- ry factors from normal human serum. *J. Immunol.*, **118**, 505 - 513 (1977).
- 14) Chase, P.S.: The effect of human serum fractions on phytohemagglutinin - and concavalin A - stimulated human lymphocyte culture. *Cell. Immunol.*, **5**, 544 - 554 (1972).
- 15) Ford, W.H., Caspary, E.A. & Shelton, B.: Purification and properties of lymphocyte inhibition factor from human serum. *Clin. Exp. Immunol.*, **15**, 169 - 179 (1973).
- 16) Chiu, K.M., Morson, R.F., Osmand, A.P. & Gewurz, H.: The effect of alpha 1 - acidglycoprotein with immune system. *Immunology*, **32**, 997 - 1005 (1977).
- 17) 杉之下俊彦: ヒト血清中の免疫抑制作用物質に関する研究, 第1編, 健康人および各種呼吸器疾患患者血清のマウスにおけるヒツジ赤血球に対する抗体産生におよぼす影響. *アレルギー*, **27**, 756 - 765 (1978).
- 18) 杉之下俊彦: ヒト血清中の免疫抑制作用物質に関する研究, 第2編, 肺癌, サルコイドーシスおよび肺結核患者血清中の免疫抑制作用物質の性状と作用機序に関する比較検討. *アレルギー*, **27**, 775 - 785 (1978).
- 19) 今井浩三, 阿部 弘, 赤保内良和, 谷内 昭: Immunoregulatory α - globulin (IRA) のリンパ球に及ぼす影響についての基礎的研究. *臨床免疫*, **7**, 309 - 314 (1975).
- 20) 石田名香雄, 田村啓二, 柴田芳美: 免疫抑制酸性蛋白の性状と癌患者における検出意義. *医学のあゆみ*, **115**, 423 - 433 (1980).
- 21) 漆崎一郎, 長井忠則, 石谷邦彦, 近藤 敦, 吉田憲基, 後町洋一: 肺癌患者の細胞性免疫能に関する研究一血清の非特異的免疫抑制作用はについて一肺結核との対比. *肺癌*, **17**, 199 - 211 (1977).
- 22) 松岡 宏, 宇理須厚雄, 鳥居新平, 松岡道子, 伊藤重光: ネフローゼ症候群患児血清にみられる免疫抑制作用について, 第1編, 非特異的 mitogen を用いた試験管内リンパ球培養法による検討. *アレルギー*, **27**, 521 - 530 (1978).
- 23) Iitaka, K. & West, C.D.: A serum inhibitor of blastogenesis in idiopathic nephrotic syndrome transferred by lymphocyte. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **12**, 62 - 71 (1979).
- 24) Amolot, P.L. & Unger, A.: Binding of phytohaemagglutinin to serum substance and inhibition of lymphocyte transformation in Hodgkin's disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**, 520 - 527 (1976).
- 25) Malvae, I., Layrisse, Z. & Laytisse, M.: Dose - dependent hyporeactivity to phytohaemagglutinin in systemic lupus erythematosus. *Cell. Immunol.*, **15**, 231 - 236 (1975).
- 26) Beatty, D.W. and Dowdel, E.B.: Deficiency in kwashiorkor serum of factors required for optimal lymphocyte transformation in vitro. *Clin. Exp. Immunol.*, **35**, 433 - 442 (1979).
- 27) Mangi, R.J., Dwyer, M. & Kantor, F.S.: The effect of plasma upon lymphocyte response in vitro. *Clin. Exp. Immunol.*, **18**, 519 - 528 (1974).
- 28) Murgita, R.A. Tomasi, T.B. Jr.: Suppression of the immune response by α - fetoprotein. I. The effect of mouse α - fetoprotein on the primary and secondary antibody response. *J. Exp. Med.*, **141**, 269 - 286 (1975).
- 29) Murgita, R.A. & Tomasi, T.B. Jr.: Suppression of the immune response by α - fetoprotein. II. The effect of mouse α - fetoprotein on mixed lymphocyte reactivity and mitogen induced lymphocyte transformation. *J. Exp. Med.*, **141**, 440 - 452 (1975).
- 30) Yachin, S. & Lester, E.: Inhibition of human lymphocyte transformation by human alphafetoprotein (HAFP); Comparison of foetal and hepatoma HAFP and kinetic studies of in vitro immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.*, **26**, 484 - 490 (1976).
- 31) Ganrot, P.O. & Schersten, B.: Serum α_2 - macroglobulin concentration and variation with age and sex. *Clin. Chim. Acta.* **15**, 113 - 120 (1967).
- 32) Grazel, A.I., Hatcher, V.B. & Lazarus, G.: Protease activity of normal PHA - stimulated human lymphocytes. *Cell. Immunol.*, **18**, 210 - 219 (1975).
- 33) Goutner, A., Simmler, M.C., Tapon, J. & Rosenfeld, C.: Modulation by α - 2 macroglobulin of human lymphocyte proliferation in response to mitogen and antigen. *Differentiation*, **5**, 171 - 173 (1976).
- 34) Hubbard, W.J. Hess, A.D., Hsia, S. & Amos, B.: The effect of electrophoretically slow and fast α - 2 macroglobulin on mixed lymphocyte culture. *J. Immunol.*, **126**, 292 - 299 (1981).
- 35) Ades, E.W., Hinson, A., Chapuis - Cellirr, C. & Arnaud, P.: Modulation of the immune response by protease inhibitors. I. α_2 - macroglobulin and α_1 - antitrypsin inhibit natural

killing and antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity. *Scand. J. Immunol.*, **15**, 109 - 113 (1982).

36) Gravagna, P., Gianazza, E., Arnaud, P., Neels, M. & Ades, E.W.: Modulation of the immune response by plasma protease inhibitors. II. Alpha₂-macroglobulin subunits inhibit natural killing cell cytotoxicity and antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity. *Scand. J. Immunol.*, **15**, 115 - 118 (1982).

37) James, K.: Alpha₂ macroglobulin and its possible importance in immune systems. *Trend. Biochem. Sci.*, **5**, 43 - 47 (1980).

38) Anderson, A. & Hjorth, N.: T lymphocyte and phytohaemagglutinin responsiveness in atopic dermatitis. *Acta Derm - Vener.*, **55**, 345 - 349 (1975).

39) Grove, D.I., Burston, T.O., Wellby, M.L., Munro Ford, R. & Forbes, I. J.: Humoral and cellular immunity in asthma. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **55**, 152 - 163 (1975).

40) Stannegård, I. - L., Lindholm, L. & Stanne-

gård, Ö.: T lymphocyte in atopic children. *Int. Arch. Allergy. appl. Immunol.*, **50**, 684 - 692 (1976).

41) McGeddy, S.J. & Buckley, R.H.: Depression of cell - mediated immunity in atopic eczema. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, **56**, 393 - 406 (1975).

42) Byron, N.A., Caballero, F., Mary - Ann Campbell, Chooi, M., Lane, A.M., Hughjones, K., Timlin, D.M. & Hobbs, J.R.: T - cell depletion and in vitro thymosin inducibility in asthmatic children. *Clin. Exp. Immunol.*, **31**, 490 - 498 (1978).

43) Stannegård, I - L. & Stannegård, Ö.: Influence of serum from atopic children on T lymphocytes. *Int. Arch. Allergy. appl. Immunol.*, **55**, 217 - 227 (1977).

44) Goren, R. & Nelken, D.: Normal immunosuppressive protein. Isolation of a glycoprotein active factor. *Immunology*, **39**, 305 - 309 (1980).

45) Lowry, O.H., Rosemberg, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J.: Protein measurement with folin phenol. *J. Bio. Chem.*, **193**, 265 - 275 (1951).

Age-dependent Changes in Inhibitory Effect of Human Sera on Phytohemagglutinin(PHA)-stimulated Lymphocyte Proliferation: Its Relationship to Serum α_2 -Macroglobulin Concentration Yoshihiro Oshida, Department of Pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920—J. Juzen Med. Soc., **92**, 1—11 (1983)

Key words: Normal human serum, PHA-stimulated lymphocyte proliferation, α_2 -Macroglobulin.

Abstract

The effect of normal human serum obtained from various ages on phytohemagglutinin(PHA)-stimulated lymphocyte proliferation was investigated in respect to the relationship between the effect and the serum α_2 -macroglobulin (α_2 -m) concentration. The effect of sera from atopic bronchial asthma was also investigated in comparison with the sera from healthy subjects. The serum samples were collected from healthy subjects and atopic bronchial asthma aged 0-75. Human sera exhibited the age-dependent changes in the inhibitory effect at the suboptimal dose of PHA(3.0 μ g/ml). Namely, the normal human sera from the young generation aged below 20 and the old generation above 61 exhibited the inhibitory effect as compared with the sera from adults(aged 21-60). Especially, the sera obtained from children aged below 5 exhibited a significant inhibitory effect. However, no significant difference existed in the effect of the human sera obtained from all age-groups at the optimal dose of PHA(7.5 μ g/ml). There was no significant difference in the effect on PHA-stimulated lymphocyte proliferation between the atopic and the normal human sera. The inhibitory effect was attributed to the protein which had a molecular weight above 50,000 and was contained in a 0-1.8M fraction by ammonium

sulfate precipitation. This inhibitory activity was denatured by heat-treatment at 80°C for 10 min. There was a significant correlation between the age-dependent changes in the inhibitory effect and the serum α_2 -m concentration. Purified α_2 -m obtained from the normal sera exhibited the dose-dependent inhibitory effect, and the serum fraction without α_2 -m lost such an inhibitory effect. These results suggest that the quantitative differences in the serum α_2 -m concentration are closely related to the age-dependent changes in the inhibitory effect of the normal human sera on PHA-stimulated lymphocyte proliferation.